

OPTIMASI EKSTRAKSI PROPOLIS MENGGUNAKAN CARA MASERASI DENGAN PELARUT ETANOL 70% DAN PEMANASAN GELOMBANG MIKRO SERTA KARAKTERISASINYA SEBAGAI BAHAN ANTIKANKER PAYUDARA

OPTIMIZATION OF PROPOLIS EXTRACTION USING MACERATION WITH 70% ETHANOL SOLVENT WITH MICROWAVE HEATING AND CHARACTERIZATION OF ITS PROPERTIES AS ANTIBREASTCANCER AGENTS

Akhmad Endang Zainal Hasan^{1)*}, Djumali Mangunwidjaja¹⁾, Titi Candra Sunarti¹⁾, Ono Suparno¹⁾, Agus Setiyono²⁾

¹⁾Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Kampus IPB Darmaga

*email : zainalhasan@ipb.ac.id

²⁾Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance collected by stingless bee or honey bee from various plants, possesses various physiological activities such as antioxidant, apoptosis induction and anticancer. The objectives of this study were to determine the optimum condition of propolis extraction and to characterize its properties as antibreastcancer agents. Extraction was conducted by using maceration with microwave-assisted ethanol maceration on 10, 20 and 30 minutes exposure. Thirteen propolis samples from Pandeglang, Banten Indonesia were used for apoptosis inducers assays by Saccharomyces cerevisiae method, and the results determined by Response Surface Methodology (RSM). The optimum extraction time and propolis solvent ratio obtained for apoptosis induction was 27 minutes and 20, respectively, and in this condition the yield was 12.67%. More over, the propolis extract exposed an antioxidizing activity with inhibitory concentration (IC₅₀), for Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) cancer cell line, and value of apoptosis induced S. cerevisiae cell of 75.34 µg.mL⁻¹, 233 µg.mL⁻¹, and 6.015 mg.mL⁻¹, respectively. In a in-vivo efficacy test against cancer cells due after induction of 7.12-dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA) showed that concentrations of propolis 233 µg.mL⁻¹ could heal damaged tumor tissue.

Keywords: propolis, apoptosis induction, MCF-7, RSM, antibreastcancer

ABSTRAK

Propolis adalah zat resin yang dikumpulkan oleh lebah madu (*stingless bee* dan *honey bee*) dari berbagai tanaman, memiliki berbagai aktivitas fisiologis seperti antioksidan, induksi apoptosis dan antikanker. Tujuan penelitian ini untuk menentukan kondisi optimum ekstraksi propolis dan karakterisasinya sebagai bahan antikanker payudara. Ekstraksi dilakukan dengan teknik maserasi dengan pemanasan gelombang mikro dengan waktu pemanasan 10, 20 dan 30 menit. Tiga belas contoh propolis dari Pandeglang, Banten Indonesia digunakan untuk uji induksi apoptosis sel *Saccharomyces cerevisiae* dan analisis data dilakukan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). Waktu ekstraksi optimum dan rasio pelarut etanol 70% sarang lebah terpilih dalam menginduksi apoptosis masing-masing selama 27 menit dan sebesar 20, dengan hasil ekstrak propolis sebanyak 12,67%. Selanjutnya, ekstrak propolis mempunyai konsentrasi dalam menghambat sebanyak 50% (IC₅₀), mematikan 50% sel lestari kanker *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7), dan induksi apoptosis *S. cerevisiae* masing-masing sebesar 75,34 µg. mL⁻¹, 233 µg.mL⁻¹, dan 6,015 µg.mL⁻¹. Hasil uji efikasi *in-vivo* terhadap sel kanker akibat induksi 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA) menunjukkan bahwa konsentrasi propolis 233 µg.mL⁻¹ dapat menyembuhkan jaringan yang rusak akibat tumor.

Kata kunci: propolis, induksi apoptosis, MCF-7, RSM, antikanker payudara

PENDAHULUAN

Propolis adalah resin yang dikumpulkan oleh lebah dari berbagai tumbuhan, yang bercampur dengan saliva dan berbagai enzim sehingga menghasilkan resin baru yang berbeda. Propolis mempunyai aktivitas antibakteri, antiparasit, antivirus dan aktivitas biologis lain seperti antiinflamasi, anestesi lokal, hepatoprotektor, antitumor, dan imunostimulan (Bankova, 2007; Fearnley, 2005; Lotfy, 2006). Daya antimikroba propolis telah dipergunakan oleh bangsa Yunani dan

Romawi sejak berabad-abad yang lalu. Sifat unik propolis menarik perhatian para peneliti sejak akhir tahun 1960-an. Selama 40 tahun terakhir, telah dipublikasikan mengenai komposisi kimia, aktivitas biologis, farmakologis propolis dan terapi penggunaannya (Khismatullina, 2005). Bahan aktif dalam propolis, seperti senyawa flavonoid dan *capeic acid phenethyl ester*, telah banyak dimanfaatkan untuk kesehatan terutama sebagai bahan antikanker. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan sel eukariot yang dapat dijadikan model pengujian aktivitas antikanker suatu bahan (de

*Penulis untuk korespondensi

Castro *et al.*, 2011). Pola kerja yang ditunjukkan hasil dari perlakuan bahan terhadap *S. cerevisiae* merupakan pola yang setara dengan daya kerja bahan sebagai antikanker (Lotti *et al.*, 2011).

Propolis pada umumnya diperoleh dengan cara mengekstrak sarang lebah yang berasal dari *Apis* sp. Selain *Apis* sp., ada salah satu jenis lebah yang bersarang di lubang bambu dan dicelah-celah rumah, yaitu lebah madu *Trigona* sp. Lebah madu ini diperkirakan menghasilkan jumlah propolis lebih banyak dibandingkan dengan *Apis* sp. dengan kandungan bahan aktif yang lebih baik. Penelitian yang dilakukan oleh Hasan *et al.* (2006) menunjukkan bahwa ekstrak etanol propolis *Trigona* sp. yang berasal dari Pandeglang memiliki aktivitas antibakteri, baik untuk bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*), maupun bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*). Tukan (2008) mendapatkan bahwa propolis Pandeglang mengandung bahan aktif yang mirip dengan *cycloartenol* sebanyak 49,91% (b/b). Data lain kandungan kimia propolis dari sarang lebah *stingless bee* diungkap oleh Matienzo dan Lamorena (2004) serta Sawaya *et al.* (2011a). Hasil uji awal propolis *Trigona* spp sebagai antikanker telah dilakukan terhadap sel *Murine* leukemia P-388 dengan nilai IC_{50} 18,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Hasil ini menunjukkan bahwa propolis *Trigona* sp. mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan antikanker.

Proses ekstraksi propolis secara umum dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut organik. Penelitian yang dilakukan oleh Park dan Ikegaki (1998) diperoleh bahwa etanol 70% mampu mengekstrak sebagian besar flavonoid jenis pinokembrin dan sakuranetin. Penggunaan etanol 70% lebih baik dibandingkan dengan etanol absolut (95%) karena perolehan ekstrak flavonoid lebih banyak. Ekstraksi propolis dengan etanol 70% menghasilkan propolis dengan aktivitas antioksidan terbaik (Park dan Ikegaki, 1998). Ekstraksi propolis menggunakan etanol 70% juga telah dilakukan oleh para peneliti untuk beragam asal propolis seperti Eropa (Sawaya *et al.*, 2004; Bankova *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2006), Brazil (Cunha *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2011a; da Silva *et al.*, 2011b; Sawaya *et al.*, 2011b), Transilvania (Mihai *et al.*, 2009) dan Libia (El-Rahman, 2010). Ekstraksi propolis dari Taiwan yang dilakukan oleh Chen *et al.* (2008) juga menggunakan pelarut etanol namun tidak menyebutkan konsentrasi etanol yang digunakan. Selain dengan maserasi, proses ekstraksi propolis juga dapat dilakukan dengan bantuan pemanasan gelombang suara dan pemanasan gelombang mikro (Trusheva *et al.*, 2007), ekstraksi *turbo* (Cottica *et al.*, 2011), ekstraksi superkritik (Paviani *et al.*, 2012) dan ekstraksi tekanan tinggi (Shouqin *et al.*, 2005). Menurut Trusheva *et al.* (2007) teknik ekstraksi menggunakan pemanasan gelombang mikro Tabel 1. Batasan dan taraf dari dua peubah

merupakan cara yang sangat cepat dalam menghasilkan asam fenolat dan flavonoid. Teknik ekstraksi dengan pemanasan gelombang mikro merupakan cara terbaik dibandingkan dengan cara *Soxhlet* maupun pemanasan gelombang suara (Dean, 1998).

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji proses ekstraksi propolis menggunakan cara maserasi dengan peubah pemanasan gelombang mikro dan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah serta karakterisasi propolis hasil ekstraksi sebagai bahan antikanker payudara.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan biologis yang digunakan adalah sarang lebah *Trigona* spp. yang berasal dari Pandeglang, Banten, model sel uji kanker (*S.cerevisiae*), AlCl_3 , sel kanker *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7). Medium dan bahan kimia yang digunakan adalah medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA), etanol 70%, *Fetal Bovine Serum* (FBS), pereaksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazo-lium bromide (MTT), dan 1,1-diphenyl-2-picril hydrazil (DPPH).

Alat yang digunakan adalah pemanas gelombang mikro (*Kriss Microwave Oven* dengan frekuensi 2450 MHz, daya 800 Watt), *laminar air flow cabinet*, inkubator, *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) (Shimadzu IR-Prestige 21), dan evaporator vakum.

Metode

Ekstraksi Propolis

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70% terhadap sarang lebah dengan nisbah tertentu pada pemanasan gelombang mikro (dimodifikasi dari Trusheva *et al.*, 2007 dan Jang *et al.*, 2009). Pada tahap ini, sarang lebah dan pelarut dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, kemudian dikocok pada *shaker* selama 18 jam dengan kecepatan 200 rpm. Setelah itu dipanaskan dengan pemanas gelombang mikro sesuai perlakuan (Tabel 1). Pemanasan dilakukan per 100 menit untuk menghindari kerusakan bahan aktif. Ekstrak dipisahkan dengan penyaringan, selanjutnya diuapkan dalam pengering vakum pada suhu $50 \pm 2^\circ\text{C}$ sampai bobot tetap. Ekstrak ditimbang dan siap digunakan untuk pengujian.

Optimasi ditentukan dengan metode *Response Surface* pada dua peubah (Tabel 1). Peubah perlakuan adalah waktu pemanasan dengan gelombang mikro dan nisbah antara pelarut etanol 70% dengan sarang lebah. Parameter uji untuk optimasi ekstraksi propolis adalah kemampuan induksi apoptosis terhadap sel *S.cerevisiae*.

Peubah (X)	Batasan dan Taraf				
	- α	-1	0	+1	+ α
Waktu pemanasan gelombang mikro, menit	5,86	10	20	30	34,12
Nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah	7,92	10	15	20	22,07

Karakterisasi Propolis

Karakterisasi propolis dilakukan dari teknik ekstraksi terpilih (pemanasan gelombang mikro selama 30 menit dan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah sebesar 20), meliputi pengujian flavonoid total, pengujian aktivitas antioksidan, identifikasi gugus fungsional, identifikasi kandungan senyawa propolis, uji induksi apoptosis *S. cerevisiae*, uji efikasi *in-vitro* terhadap sel kanker payudara dan uji efikasi *in-vivo* terhadap sel kanker payudara.

Pengujian Flavonoid Total

Kandungan flavonoid total ditentukan dengan metode Chang *et al.* (2002) dengan modifikasi. Pengujian dilakukan menggunakan AlCl_3 yang diukur dengan metode pewarnaan.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan propolis diuji dengan metode Cottica *et al.* (2011) yang dimodifikasi untuk melihat penghambatan oksidasi radikal bebas DPPH.

Identifikasi Gugus Fungsional

Identifikasi gugus fungsional dari propolis dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR dengan jarak serapan inframerah dari 4000 cm^{-1} hingga 400 cm^{-1} . Contoh disiapkan dengan mencampur propolis dengan KBr.

Identifikasi Kandungan Senyawa Propolis

Identifikasi senyawa yang terkandung dalam propolis dilakukan menggunakan HPLC Shimadzu dengan jarak waktu serapan hingga 90 menit. Contoh disiapkan dengan diekstraksi menggunakan metanol. Suhu kolom 30°C dengan laju alir $1\text{ mL}\cdot\text{menit}^{-1}$ menggunakan kolom C-18 SC-04 Innertsil ODS2 (125 x 4,0 mm) $5,0\text{ }\mu\text{m}$ dengan volume injeksi $20\text{ }\mu\text{L}$.

Uji Induksi Apoptosis *S. cerevisiae*.

Pengujian induksi apoptosis terhadap *S. cerevisiae* dilakukan sesuai dengan metode Laun *et al.* (2001) yang dimodifikasi.

Uji Efikasi *in-vitro* terhadap Sel Kanker Payudara

Uji ini dilakukan dengan metode MTT-assay. Sel dibiakan dalam medium RPMI 1640, FBS 10%, fungizon 0,5% dan penisilin-streptomisin 2%. Garam tetrazolium yang berasal dari media akan masuk ke dalam sel yang hidup dan berubah menjadi formazan yang berwarna ungu. Konsentrasi formazan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup.

Uji Efikasi *in-vivo* terhadap Sel Kanker Payudara

Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina putih *Sprague-Dawley*, sehat dan mempunyai aktivitas normal, umur sekitar 1-1,5 bulan dengan berat badan 150-200 g (Abbasalipourkabir *et al.*, 2010; Padmavathi *et al.*, 2006). Sebelum perlakuan induksi dengan DMBA, tikus diadaptasikan selama tiga minggu untuk menyeragamkan cara hidup dan makanannya. Sebelum dan selama perlakuan, tikus diberikan pakan standar dan minum akuades (*ad libitum*). Hewan uji dibagi menjadi enam kelompok dengan empat ekor tikus dalam setiap kelompok. Induksi kanker payudara dilakukan pada lima kelompok dengan penyuntikan secara *intraperitoneal* dengan DMBA dosis $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Setelah 90 hari, hewan coba disuntik secara *intraperitoneal* dengan bahan uji sesuai konsentrasi perlakuan propolis $233\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ yang dilakukan setiap 7 hari sekali selama 60 hari. Setelah 60 hari, semua tikus dilakukan nekropsi. Jaringan yang terkena kanker dipreparasi untuk pemeriksaan secara histopatologi.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dengan *Response Surface Methodology* (RSM) untuk menentukan batasan dan taraf dari dua peubah bebas (waktu pemanasan dengan gelombang mikro dan nisbah pelarut etanol 70% dengan sarang lebah). Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan bantuan *Design Expert 7.0.0 (free trial)*. Model matematika

yang digunakan sebagai berikut : $Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i +$

$$\sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon_{ij}, \text{ dengan } Y :$$

respon (frekuensi *petite* dan hasil), β_0 : tetapan, $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$: koefisien dari peubah bebas (X), X adalah peubah bebas dengan tanpa sandi (waktu = X_1 taraf 10, 20 dan 30 menit; nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah = X_2 taraf 10, 15 dan 20), dan ε adalah galat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Propolis

Tabel 2 menunjukkan hasil ekstraksi sarang lebah berupa ekstrak propolis dan kemampuan induksi apoptosis (% sel *petite*). Hasil yang diperoleh beragam sesuai perlakuan, mulai dari 0,17 hingga 17,48% (b/b). Pola peta hasil propolis disajikan pada Gambar 1, menunjukkan bahwa perolehan ekstrak berhubungan dengan jumlah

etanol 70% yang digunakan, makin banyak etanol yang digunakan makin banyak rongga dalam pelarut yang dapat diisi oleh komponen sarang lebah yang dapat dikeluarkan. Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut merupakan pilihan tepat sesuai dengan penelitian Muli dan Maingi (2007) bahwa etanol 70% merupakan pelarut yang dapat melarutkan bahan aktif propolis paling aktif dibandingkan dengan konsentrasi etanol lainnya (30, 50 dan 90%). Menurut Park dan Ikegaki (1998) penggunaan etanol 70% sebagai pelarut menghasilkan propolis dengan aktivitas antioksidan terbesar. Hal yang sama juga diperlihatkan Bankova *et al.* (2002), dan Cunha *et al.* (2006) dalam ekstraksi propolis. Demikian pula dengan waktu pemanasan gelombang mikro, makin lama waktu pemanasan makin banyak partikel yang bertumbukkan antara pelarut dan sarang lebah. Pemanasan akibat gelombang mikro menyebabkan molekul terpolarisasi dengan baik, sehingga bahan

aktif yang terekstrak keluar dan berdifusi ke dalam pelarut (Dean, 1998). Menurut Kim *et al.* (2009), konsentrasi etanol 68-82% merupakan pelarut yang dapat menghasilkan total flavonoid maksimal.

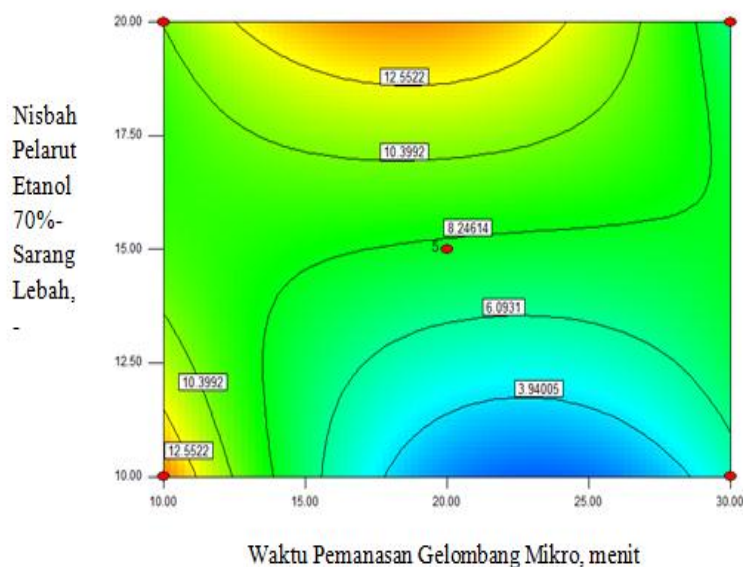
Berdasarkan analisis RSM, model persamaan yang diperoleh dari hasil ekstraksi propolis adalah

$$Y = 7,95 - 0,78X_1 + 5,93X_2 + 0,82X_{12} + 0,50X_{22} + 1,42X_1X_2 - 6,61X_{12}X_2 - 2,53X_1X_{22},$$

dengan $R^2 = 0,98$. Dari persamaan tersebut diperkirakan hasil optimal sebesar 10,19% dicapai pada kondisi pemanasan gelombang mikro selama 27 menit dan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah sebesar 20.

Tabel 2. Hasil ekstrak propolis (% b/b) dan hasil pengujian induksi apoptosis (jumlah sel *petite*, %)

Satuan percobaan	Waktu pemanasan, menit	Nisbah pelarut etanol 70%-sarang lebah	Rata-rata hasil, % (b/b)	Rata-rata jumlah sel <i>petite</i> (%)
1	10	10	15,15	68,97
2	10	20	10,92	65,97
3	5,86	15	10,25	66,78
4	34,14	15	8,04	81,63
5	30	20	7,13	84,9
6	30	10	5,68	74,66
7	20	7,93	0,15	67,62
8	20	22,07	16,88	65
9	20	15	7,55	78,73
10	20	15	8,56	74,31
11	20	15	8,12	62,39
12	20	15	6,83	78,38
13	20	15	8,71	68,48



Gambar 1. Kontur permukaan hasil ekstrak propolis dari ekstraksi sarang lebah dengan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah (X_1) dan pemanasan gelombang mikro (X_2)

Hasil verifikasi ekstraksi diperoleh ekstrak propolis sebanyak 12,67%. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Cunha *et al.* (2004) dengan pelarut yang sama sekitar 6,41 sampai dengan 16,24% (b/b). Penggunaan teknik maserasi selama 18 jam yang diikuti perlakuan pemanasan gelombang mikro belum memberikan hasil yang memuaskan karena teknik maserasi selama tujuh hari diperoleh hasil sebesar 24,66% (Hasan *et al.*, 2011), sedangkan Naama *et al.* (2011) menghasilkan ekstrak sebanyak 25,67% pada waktu maserasi yang sama. Perbedaan nilai hasil yang diperoleh dipengaruhi jenis tumbuhan tempat lebah *Trigona* sp. mendapatkan bahan baku propolis, musim, dan lokasi geografi tempat pengambilan sarang lebah (Bankova, 2007).

Pada Gambar 2, nampak bahwa makin lama waktu pemanasan gelombang mikro dan makin besarnya nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah maka besar pula kemampuan menginduksi apoptosis. Persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis makin banyak tersebut nampak pada formula kondisi waktu pemanasan gelombang mikro 30 menit dengan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah sebesar 20.

Kemampuan induksi apoptosis sel *S.cerevisiae* ditunjukkan dengan persentase jumlah sel yang mengalami pengecilan ukuran (jumlah sel *petite*, %). Berdasarkan analisis RSM model persamaan yang menunjukkan kemampuan induksi apoptosis sel *S.cerevisiae* adalah

$$Y = 72,64 + 5,25X_1 - 0,93X_2 + 1,72X_{12} - 2,23X_{22} + 3,31X_1X_2 + 2,74X_{12}X_2 + 0,90X_1X_{22},$$

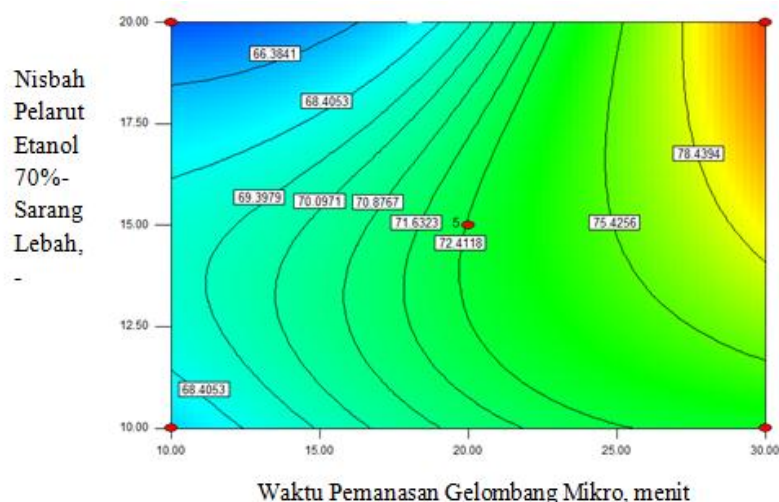
dengan $R^2 = 0,64$. Dari persamaan tersebut diperkirakan induksi apoptosis menghasilkan sel *petite* sebanyak 78,13% dicapai pada kondisi waktu

pemanasan 27 menit dan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah sebesar 20. Hasil verifikasi menunjukkan kemampuan induksi apoptosis dengan jumlah persentase sel *petite* sebanyak 70,32%.

Karakteristik Ekstrak Propolis

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang terdapat dalam propolis dan kadarnya berhubungan dengan warna sarang lebah. Propolis yang berwarna lebih gelap mengandung flavonoid lebih banyak, sehingga hasilnya yang lebih banyak dibandingkan dengan propolis berwarna lebih muda (Woo, 2004). Flavonoid ini merupakan bahan aktif pada propolis. Warna merupakan penanda tinggi rendahnya kandungan bahan aktif suatu objek (Suparno *et al.*, 2007) atau kandungan bahan kimia suatu bahan (Suparno *et al.*, 2009).

Propolis yang dihasilkan dari ekstraksi terpilih memiliki warna coklat sampai coklat kehitaman dengan konsistensi lembek. Propolis ini larut sempurna dalam propilen glikol dan etanol 70% tapi tidak larut dalam air. Pengukuran kadar total flavonoid propolis diperoleh sebesar $30,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ atau sebanyak 15,31% (b/b). Hasil penelitian relatif lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Trusheva *et al.* (2007) yang menghasilkan total flavonoid sebanyak 69%. Namun, hasil ini relatif lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2010) yang membandingkan propolis asal Brazil (10,38%) dan Taiwan (20,60–24,91%). Penelitian lain yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2000) dan Yaghoubi *et al.* (2007) terhadap propolis Brazil diperoleh kadar total flavonoid 7,3%. Variasi kadar total flavonoid ini dipengaruhi oleh warna sarang lebah, asal tanaman dan lokasi pengambilan sarang lebah, sesuai dengan pernyataan Bankova (2007).



Gambar 2. Kontur permukaan jumlah sel *petite* (%) akibat perlakuan propolis yang diekstraksi dari sarang lebah dengan nisbah pelarut etanol 70% sarang lebah (X_1) dan pemanasan gelombang mikro (X_2)

Hasil penelusuran gugus fungsional propolis diperoleh adanya gugus fungsional -OH pada panjang gelombang 3267, 41 cm^{-1} yang sangat jelas (Gambar 3). Gugus lain seperti -CH (2931,80 cm^{-1}), -H (2376,30, 2345,44 dan 2322,29 cm^{-1}), dan C=C, C=O atau C=N (1724,36, 1658,78 dan 1600,92 cm^{-1}) juga nampak pada hasil FTIR propolis tersebut. Dengan adanya gugus -OH yang sangat jelas tersebut menunjukkan bahwa propolis mengandung senyawa fenol terutama flavonoid. Hal ini terbukti bahwa propolis di Indonesia mengandung senyawa flavonoid sesuai dengan penelitian Hasan *et al.* (2011). Adanya senyawa mudah menguap dalam propolis *Trigona spp* ini terlihat pada Gambar 3 dengan puncak yang muncul pada serapan yang lebih panjang (1600 hingga 400 cm^{-1}).

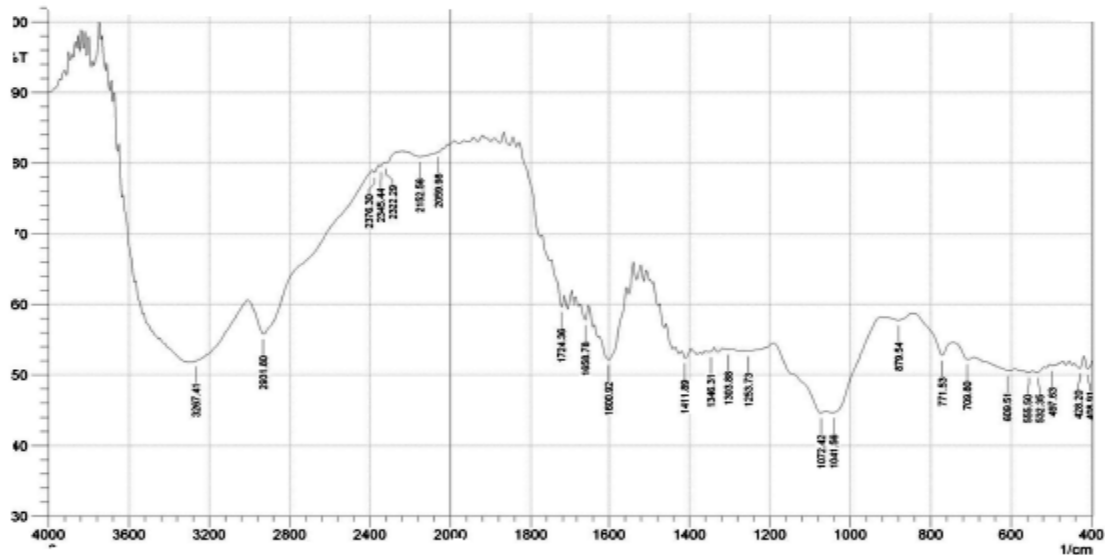
Hasil analisis HPLC untuk penelusuran kandungan kimia propolis secara kualitatif, berdasarkan waktu resistensi terlihat adanya asam firulat (29,795%), *techtchrysin* (14,153%), pinokembrin (7,726%), asam kumarat (2,330%), galangin (1,765%), pinobanskin (0,982%), asam salisilat (0,539%), kuersetin (0,373%), fisetin (0,188%), *protocatechic acid* (0,118%), *chrysin* (0,080%), asam kafeat (0,0620 %) dan epigenin (0,018%). Hasil ini membuktikan bahwa propolis asal Pandeglang, Indonesia mengandung flavonoid dan asam organik. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Szliszka *et al.* (2009) bahwa propolis hasil ekstraksi dengan etanol banyak mengandung asam fenolat dan flavonoid.

Komponen flavonoid (seperti krisin atau kuersetin) dan asam organik (seperti asam firulat atau asam kafeat) merupakan senyawa aktif yang dapat bersifat antioksidan, yang ditunjukkan oleh adanya kemampuan mereduksi radikal bebas DPPH. Keberadaan suatu antioksidan merupakan hal yang

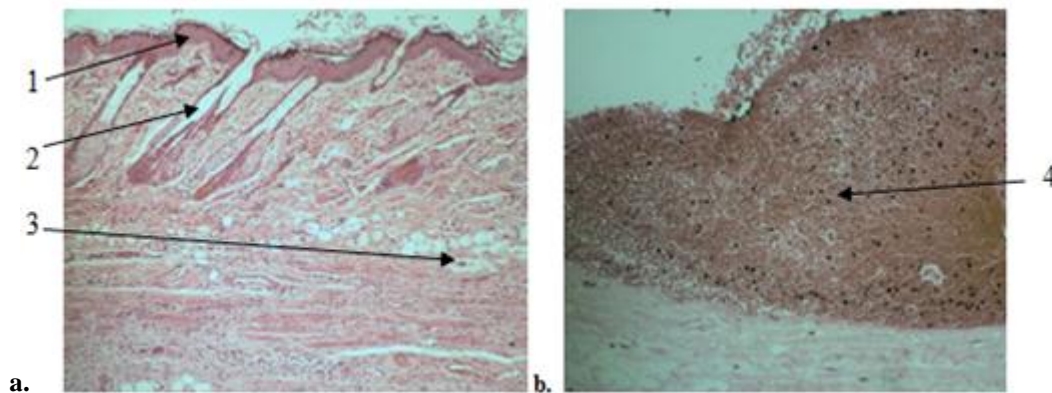
penting dalam formulasi obat. Aktivitas antioksidan ini dipengaruhi oleh keberadaan flavonoid dalam propolis (Park dan Ikegaki, 1998). Makin kecil nilai IC_{50} makin besar kemampuannya sebagai bahan antioksidan. Hasil pengukuran antioksidan propolis dengan metode DPPH diperoleh IC_{50} sebesar 75,677 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Penelitian yang dilakukan oleh Cottica *et al.* (2011) mendapatkan nilai reduksi radikal bebas dari propolis Brazil berkisar antara 47 hingga 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sedangkan nilai IC_{50} yang sangat kecil diperoleh dari kandungan mudah menguap dari India sekitar 0,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Naik dan Vaidya, 2011). Perbedaan nilai IC_{50} ini disebabkan oleh asal propolis dan waktu pengambilan sarang lebah.

Pengujian kemampuan propolis dalam menghambat pertumbuhan sel *eukariot* atau induksi apoptosis dilakukan menggunakan sel model *S. cerevisiae*. Pola induksi terhadap *S. cerevisiae* adalah dengan menghambat pembentukan enzim pembawa gen *Pdr5p* (Lotti *et al.*, 2011). Pada konsentrasi 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ kemampuan menginduksi apoptosis sel *S. cerevisiae* sebesar 70,323% atau IC_{50} sebesar 6,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Hasil menunjukkan lebih besar dibandingkan dengan Lotti (2011) dari contoh yang diujikan terdapat propolis asal Brazil yang mempunyai IC_{50} sekitar 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Hal ini menunjukkan bahwa propolis asal Pandeglang cukup potensial sebagai bahan untuk antikanker.

Pengujian aktivitas propolis dalam mematikan sel kanker payudara secara *in-vitro* dilakukan terhadap sel kanker MCF-7 menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 233 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Hasil penelitian Syamsuddin *et al.* (2011) menemukan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etilasetat propolis asal Grinsing, Jawa Tengah lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak butanol yaitu 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dibanding dengan 47.45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Makin kecil nilai IC_{50} makin aktif propolis sebagai agen antiproliferasi sel kanker.



Gambar 3. Tampilan kromatogram FTIR propolis pada rentang 400-400 cm^{-1}



Gambar 4. Jaringan tumor *mamae* tikus betina setelah di induksi oleh DMBA dan mendapat perlakuan penyuntikkan a. propolis ($233 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dan b. NaCl fisiologis (kontrol positif) (1=epitel kulit, 2=folikel rambut normal, 3=angiogenesis, dan 4=proliferasi sel tumor)

Pengujian aktivitas propolis dalam menyembuhkan kanker terlihat bahwa pada konsentrasi propolis $233 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dapat menyembuhkan jaringan rusak akibat tumor (Gambar 4), sedangkan penelitian Inoue *et al.* (2008) menunjukkan bahwa penghambatan pertumbuhan kanker terjadi setelah konsentrasi propolis $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Demikian pula dengan Bermúdez *et al.* (2006), penyembuhan luka pada konsentrasi propolis 10% hanya terjadi sebanyak 60% saja yaitu dengan terjadinya perbaikan jaringan kulit. Proses penyembuhan terlihat dengan adanya perbaikan sel dan jaringan di sekitar jaringan yang rusak yaitu dengan terjadinya reepitilasi (penunjuk no. 1), folikel rambut (penunjuk 2) dan terjadi penghambatan proses angiogenesis (penunjuk no. 3) pada Gambar 4a, sedangkan pada jaringan *mamae* yang hanya diinduksi DMBA dan tidak dilakukan perlakuan propolis, terbentuk luka dan dalam

jaringan banyak terdapat sel kanker (Gambar 4b). Adanya senyawa asam organik, polifenol dan flavonoid dalam propolis berperan menghambat proliferasi sel kanker. Hal ini karena flavonoid maupun asam kafeat mampu menghambat protein kinase yang digunakan untuk proliferasi sel, sehingga terjadi penghambatan proses pembentukan sel yang berakibat terjadinya apoptosis (Madeo *et al.*, 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Propolis hasil ekstraksi menggunakan cara maserasi selama 18 jam dengan etanol 70% dengan nisbah 22 terhadap sarang lebah dan dilanjutkan dengan pemanasan gelombang mikro selama 33 menit diperoleh hasil ekstrak propolis sebanyak

12,67% dan mempunyai kemampuan induksi apoptosis sel *S. cerevisiae* sebesar 70,32%.

Propolis *Trigona* spp. asal Pandeglang, Banten Indonesia mempunyai aktivitas antioksidan (IC_{50}) sebesar $75,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mematikan 50% sel kanker MCF-7 pada konsentrasi $233 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dengan nilai IC_{50} induksi apoptosis sel *S. cerevisiae* sebesar $6,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Hasil uji efikasi *in-vivo* terhadap sel kanker akibat induksi DMBA menunjukkan bahwa konsentrasi propolis $233 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dapat menyembuhkan jaringan yang rusak akibat tumor dan sudah menunjukkan kemampuan dalam mengeliminir tumor.

Saran

Perlu pengujian propolis terhadap sel kanker lestari selain MCF-7 untuk mendukung pemanfaatannya sebagai antikanker payudara.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Direktur Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas beasiswa BPPS dan Direktur SEAMEO-BIOTROP serta Direktur PT Deltana Prima atas biaya penelitian yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A, dan Abdullah R. 2010. Antitumor Activity of Tamoxifen Loaded Solid Lipid Nanoparticles on Induced Mammary Tumor Gland in Sprague-Dawley rats. *Afr J Biotech*. 9(43): 7337-7345.
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. 2002. Chemical Composition of Euro-pean Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z Naturforsch*. 57(5-6):530-533.
- Bankova V. 2007. Propolis of Stingless Bee: A Promising Source of Biologically Active Compounds. *Pharmacog Rev*. 1: 88-92.
- Bermúdez IC, García GS, Piloto AA, Pérez YF, Valdivieso AG. 2006. Effect of The Cuban Propolis Collected in Manzanillo Area on the Wounds Healing in Rats. *Pharmacol*. 3:416-421.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Analysis* 10:178-182.
- Chen YW, Wu SW, Ho KK, Lin SB, Huang CY, Chen CN. 2008. Characterisation of Taiwanese Propolis Collected from Different Locations and Seasons. *J Sci Food Agric*. 88:412-419.
- Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM, Visentainer JV. 2011. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *J Braz Chem Soc*. 22 (5): 929-935.
- Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO. 2004. Factors That Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. *J Braz Chem Soc*. 15:964-970.
- Cunha IBS, Rodrigues MLT, Meurer EC, Bankova VS, Marcucci MC, Eberlin MN, Sawaya ACHF. 2006. Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. *J Apicultural Res*. 45 (3):137-144.
- da Silva FC, Trindade CSF, de Alencar SM, Thomazini M, Balieiro JCC. 2011a. Phy-Sicochemical Properties, Antioxidat Activity and Stability of Spary-Dried Propolis. *J Apiprodukt Apimedical Sci*. 3(2):94-100.
- da Silva KR, Mathias FT, Dutra KA, Kleinubing AD, Santa HSD, Buriol L, Torres YR, Monteiro MC. 2011b. Antimicrobial Activity from a Brazilian Propolis Oily Extract Compared with Other Propolis Extracts. *Rev Ciênc Exatas Naturis*. 12 (2): 327-338.
- Dean JM. 1998. *Extraction Methods for Environmental Analysis*. London: John Wiley and Sons.
- de Castro PA, Savoldi M, Bonattio D, Barros MH, Goldman MHS, Berretta AA, Goldman GH. 2011. Molecular Characterization of Propolis Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucariotic Cell*. 10 (3):398-411.
- El-Rahman SSA. 2010. West-Libyan propolis and rosemary have synergistic anti-tumor effect against 12-O-tetradecnoylphorbol 13-acetate-induced skin tumor in BULB/C mice previously initiated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Basic Applied Pathol*. 3:46-51.
- Fearnley J. 2005. *Bee Propolis: Natural Healing from the Hive*. London: Souvenir Press Ltd.
- Hasan AEZ, Artika IM, Fatoni A, Kuswandi, Haryanto B. 2011. Antibacterial Activity of Propolis *Trigona* spp from Bukittinggi, West Sumatera against *Salmonella* sp. *Chem Progress*. 4 (2):55-59.
- Hasan AEZ, Artika IM, Kasno, Anggraini AD. 2006. Uji Aktivitas Antibakteri Propolis Lebah Madu *Trigona* spp. Di dalam : Arifin BT, Wukirsari, Gunawan S, Wahyuni WT. *Seminar Nasional HKI*; Bogor, 12 Sep 2006. Bogor: Departemen Kimia, FMIPA IPB dan Himpunan Kimia Indonesia. 2007. hlm 204-215.

- Inoue K, Saito M, Kanai T, Kawata T, Shigematsu N, Uno T, Isobe K, Liu CH, Ito H. 2008. Antitumor Effects of Water Soluble Propolis on a Mouse Sarcoma Cell Line in Vivo and in Vitro. *Am J Chin Med*. 36 (3): 625-634.
- Jang MJ, Sheu SR, Wang CC, Yeh YL, Sung KH. 2009. *Optimization Analysis of the Experimental Para-meters on the Extraction Process of Propolis*. Proceedings of the International Multi Conference of Engineers and Computer Scientists. II, IMECS 2009. Hongkong. <http://www.iaeng.org/publication/IMECS2009/> IMECS 2009_ pp1295-1299 [27 Oktober 2010].
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Lee KH, Lee SH, Lee DS, Cho SK, Hur SS, Kwon TK, Lee JM. 2009. Optimization of Ethanol Extraction Conditions from Propolis (a Bee Product) Using Response Surface Methodology. *Kor J Food Preserv*. 16 (6): 908-914.
- Khismatullina N. 2005. *Apitherapy : Guidelines for more effective use*. Rusia: Mobile Ltd.
- Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kohlwein S, Dawes I, Froehlich KU, Breitenbach M. 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol*. 39(5):1166-1173.
- Lotfy M. 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pac J Cancer Prev*. 7:22-31.
- Lotti C, de Castro GMM, de Sá LFR, da Silva BAFS, Tessis AC, Piccinelli AL, Rastrelli L, Pereira AF. 2011. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. *J Pharma Braz*. 21(5): 901-908.
- Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenber T, Frohlich KU. 2004. Apoptosis in yeast. DOI 10.1016/j.mib.2004.10.012. *Current Opinion Microbiol*. 7:655-660.
- Matienzo AC dan Lamorena M. 2004. Extration and initial characterization of propolis from stingless bees (*Trigona biroi* Friese). Di dalam: Proceeding of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora; Los Banos, Univ. of the Philippines. 23-27 Feb 2004. Laguna: UPLB-BP, College, Laguna (Philippines). hlm 321-329.
- Mihai CM, Marghitas LAI, Dezmirean D, Maghear O, Margaon R, Laslo LS. 2009. Transylvanian Propolis from 7 Counties Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolics. *Bull UASVM Animal Sci Biotech*. 66(1-2):259-264.
- Muli EM dan Maingi JM. 2007. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J Venom Anim Toxins Trop*. 13(3):655-663.
- Naama JH, Nima ZA, dan Suleiman GM. 2010. Effects of Active Materials in Alcoholic Extract of Iraqi Propolis on Growth of Some Cancer Lines in the Laboratory and Cancer of Mammary Gland in Mice. *Report and Opinion*. 2 (5):76-85.
- Naik DG dan Vaidya HS. 2011. Antioxidant properties of volatile oil of Indian propolis. *J ApiProduct ApiMedical Sci*. 3 (2):89-93.
- Padmavathi R, Senthilnathan P, Chodon D, Sakthisekaran D. 2006. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Life Sci*. 78: 2820-2825.
- Park YK dan Ikegaki M. 1998. Preparation of Water and Ethanolic of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosci Biotech Biochem*. 62 (11): 2230-2232.
- Paviani LC, Saito E, Dariva C, Marcucci MC, Sanchez-Camargo AP, Cabral FA. 2012. Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Braz J Chem Eng*. 29 (02): 243-251.
- Sawaya ACHF, Calado JCP, dos Santos LC, Marcucci MC, Akatsu IP, Soares AER, Abdelnur PV. 2011a. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. *J ApiProduct ApiMedical Sci*. 1 (2): 37-42.
- Sawaya ACHF, Cunha IBS dan Marcucci MC. 2011b. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Central J*. 5 (27):1-10.
- Sawaya ACHF, Calado JCP, Souza KS, Marcucci MC, Cunha IBS, Shimizu MT. 2004. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in-vitro* activity against Gram-positive bacteria. *Braz J Microbiol*. 35 (1-2).
- Shouqin Zh, Jun X, dan Changzheng W. 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J Chem Technol Biotechnol*. 80:50-54.
- Suparno O, Covington AD, dan Evans CS. 2007. Application of diphenols for dyeing. *J Soc Leather Technol Chem*. 93:139-141.
- Suparno O, Kartika IA, dan Muslich. 2009. Chamois leather tanning using rubber seed oil. *J Soc Leather Technol Chem*. 93:158-161.
- Syamsuddin, Simanjuntak P, Djamil R, Heffen WL. 2010. Apoptosis of human Breast Cancer Cells induced by Ethylacetate Extracts of

- Propolis. *Am J Biochem Biotech.* 6(2):84-88.
- Szliszka E, Czuba ZP, Domino M, Mazur B, Zydowicz G, Krol W. 2009. Ethanolic Extract of Propolis (EEP) Enhances the Apoptosis-Inducing Potential of TRAIL in Cancer Cells. *Molecules.* 14:738-754.
- Trusheva B, Trunkova D, dan Bankova V. 2006. Preliminary communication, Different Extraction Methods of Biologically Active Components from Propolis: A Preliminary Study. *Chem Center.* 1(13):1-4.
- Tukan G. 2008. Pengaruh Propolis *Trigona* spp asal Pandeglang terhadap Beberapa Isolat Bakteri Usus Sapi dan Penelusuran Komponen Aktifnya. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Yaghoubi SMJ, Ghorbani GR, Soleimanian ZS, Satari R. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU.* 15 (1): 45-48.
- Wang W, Weng X, Cheng D. 2000. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera*. *T Chen Food Chem.* 71: 45-49.
- Woo KS. 2004. Use of bee venom and propolis for apitherapy in Korea. Di dalam: Camaya EN, Cervancia C. (eds.). Proceeding of the 7th Asian Apicultural Association Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora; Los Banos, Univ. of the Philippines. 23-27 Feb 2004. Laguna: UPLB-BP, College, Laguna (Philippines). hlm 311-315.